

HER2/neu 扩增和淋巴管浸润(LVI) 在 T1 乳腺癌腋窝淋巴结转移的预测价值*

詹 颖^a, 马少君^b, 刘延梅^c (陕西省人民医院 a. 检验科; b. 放射科; c. 西院病区, 西安 710068)

摘要:目的 探讨 HER2/neu 扩增和淋巴管浸润(LVI)在 T1 期(肿块小于 2 cm)乳腺癌腋窝淋巴结转移中的预测价值。方法 将 206 例有或无淋巴结转移的 T1 乳腺癌患者应用免疫组织化学(IHC)、荧光原位杂交(FISH)及临床病理因素相关性如年龄、肿瘤大小(T1a, T1b, T1c)、组织学分级、核分级、淋巴管浸润(LVI)、雌激素和孕激素受体状态、HER2/neu 表达、Ki-67 标记指数和 Bcl-2 表达进行分析,探讨各项因素与 T1 期乳腺癌腋窝淋巴结转移的相关性。结果 206 例 T1 乳腺癌患者中 139 例淋巴结阴性(T1N0),其余 67 例淋巴结阳性(T1N1-3),年龄($\chi^2=6.484$, $P=0.011$),LVI($\chi^2=72.813$, $P<0.001$),组织学分级($\chi^2=74.813$, $P=0.019$),HER2/neu($\chi^2=72.813$, $P<0.005$),Ki-67($\chi^2=6.255$, $P=0.012$)和 Bcl-2($\chi^2=4.977$, $P=0.026$)的表达,LVI 和 HER2/neu 是有显著统计学意义的淋巴结转移预测因素,而诸如肿瘤大小($\chi^2=1.544$, $P=0.254$)、手术方法($\chi^2=2.414$, $P=0.120$)、核分级 HG($\chi^2=2.017$, $P=0.159$)、ERC 雌激素受体($\chi^2=0.140$, $P=0.709$)、PgR 孕激素受体($\chi^2=2.199$, $P=0.145$)则与早期乳腺癌淋巴结转移无明显统计学相关性。结论 HER2/neu 过度表达和淋巴管浸润 LVI 与 T1 期乳腺癌患者淋巴结转移相关,LVI 是临床最有价值预测性因素。

关键词: 乳腺肿瘤; HER2/neu; 淋巴管浸润

中图分类号: R737.9; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)03-087-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.03.025

Predictive Value of HER2/neu Amplification and Lymphovascular Invasion for Axillary Lymph Node Metastasis in Early Breast Cancer Patients

ZHAN Jie^a, MA Shao-jun^b, LIU Yan-mei^c

(a. Department of Clinical Laboratory; b. Department of Radiology;

c. Department of West Ward, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: **Objective** To study the predictive value of HER2/neu amplification and lymphovascular invasion for axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer patients (mass < 2 cm). **Methods** Reviewed the medical record of 206 T1 breast cancer patients who were the presence or absence of lymph node metastasis with IHC and FISH, analyzed the association between ALNM and various clinicopathological predictive factors such as age, tumor size (T1a, T1b, T1c), multiplicity, the histologic grade, the nuclear grade, the presence of lymphovascular invasion (LVI), the estrogen and progesterone receptor status, an HER2/neu expression, the Ki-67 labeling index and the bcl-2 expression, and discussed the correlation of the various factors with axillary lymph node metastasis of T1 breast cancer. **Results** One hundred and thirty-nine were the node negative group (T1N0) and the remaining 67 cases were allotted to the node positive group (T1N1-3), age ($\chi^2=6.484$, $P=0.011$), LVI ($\chi^2=72.813$, $P<0.001$), histologic grade ($\chi^2=74.813$, $P=0.019$), HER2/neu ($\chi^2=72.813$, $P<0.005$), Ki-67 ($\chi^2=6.255$, $P=0.012$) and bcl-2 ($\chi^2=4.977$, $P=0.026$) were the statistically significant predictive factors related to node metastasis. The factors such as tumor size ($\chi^2=1.544$, $P=0.254$), surgical method ($\chi^2=2.414$, $P=0.120$), and nuclear grading HG ($\chi^2=2.017$, $P=0.159$), estrogen receptors ER ($\chi^2=0.140$, $P=0.709$), progesterone receptor PgR ($\chi^2=2.199$, $P=0.145$), have no significant statistical correlation with early breast cancer lymph node metastasis. **Conclusion** HER2/neu overexpression and LVI were related to the increased incidence of ALNM in T1 breast cancer patients, LVI was the most predictive factor of ALNM.

Keywords: breast neoplasms; HER2/neu; lymphovascular invasion

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,患者多死于转移或复发。腋窝淋巴结是否转移是影响乳腺癌患者预后的一个重要因素,乳腺癌淋巴结转移的发病率增加常随肿瘤的大小而增加,判断影响早期乳腺癌患者腋窝淋巴结转移的临床因素与每个患者的个性化治疗及精确的风险评估是必不可少的,文献报道腋窝淋巴结转移(ALNM)临床预测

包括肿瘤大小超过 2 cm,浸润性边缘和高 Ki-67 指数^[1]。一些研究者认为 ALNM 表现与年龄相关,也有文献报道肿瘤大小,浸润性导管和小叶的细胞类型,淋巴管浸润(LVI)和孕激素受体状态为亚洲乳腺癌腋窝淋巴结转移的独立预测因子^[2]。淋巴管浸润 LVI 在许多研究中也证明是相关性较强的腋窝淋巴结转移 ALNM 预测因子,但它还没有

* 作者简介:詹 颖(1971-),女,本科,主管技师,主要从事临床医学检验工作。

通讯作者:马少君(1975-),男,本科,副主任医师。

得到充分的研究^[3],尽管许多大量研究和验证性的结果,仍然没有对小于2 cm 乳腺癌 ALNM 有效的预测因素的研究^[4],故本研究探讨了 T1 乳腺癌患者的临床预测因素。

1 材料和方法

1.1 研究对象 收集陕西省人民医院 2007 年~2012 年经历外科手术及病理确诊的 206 例浸润性导管癌或浸润性导管癌和混合浸润小叶癌的患者,我们根据 ALNM 存在或不存在将其分为两组。淋巴结阴性组为 T1N0 乳腺癌,淋巴结阳性组包括 T1N1, T1N2, T1N3 乳腺癌。所有病例手术方法是保乳手术 (BCS) 或乳房切除术,前哨淋巴结活检。前哨淋巴结活检阳性在冰冻活检时进行标准的腋窝淋巴结清扫术。我们测量了原发肿瘤,细分为 T1a, T1b 和 T1c 期,根据肿瘤大小的定义。T1a 期定义为肿瘤 <0.5 cm, T1b 期定义为 >0.5 cm,但不得 >1 cm,与 T1c 期定义为 >1 cm,但不超过 2 cm。我们将患者年龄以 40 岁分组,并分析各个组的年龄分布趋势。由两位富有经验的病理科医生评估病理预后因素,如肿瘤大小,病理分级 HG,核分级 NG, ER, PgR, HER2/neu, Ki-67 和 Bcl-2,免疫组化评估 ER, PgR, Ki-67 和 Bcl-2 蛋白表达和荧光原位杂交 (FISH) 评估 HER2/neu 扩增。

1.2 试剂和主要设备

1.2.1 免疫组织化学染色检测: Bcl-2 和 Ki-67 用抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物化酶复合法进行 (Vector Laboratories, 旧金山, 美国)。切片对比染色用 Mayer 苏木精。

1.2.2 Bcl-2 的测量: 切片用单克隆鼠抗人 Bcl-2 蛋白孵育 (1:100; DAKO, Glostrup, 丹麦) 和棕色的核染色检查。对于 Ki-67 检测, 切片单克隆小鼠抗人 Ki-67 抗原孵育 (1:100; DAKO)。

1.2.3 荧光原位杂交 (FISH) 检测: HER2/neu 试剂盒购自北京金菩嘉公司 DNA FISH 探针, 内含 GLPHER-2/CSP 17 (CSP 17 为对照探针) 探针, 缓冲液及 DAPI 复染剂。

1.2.4 主要设备: 荧光显微镜, 漩涡混合器, 电热恒温培养箱, 烤片机, 恒温水浴箱。

1.3 方法 病理标本为组织切除后 1 h 内用 10% 中性缓冲福尔马林液固定, 固定时间为 6~48 h, 石蜡包埋, 并于 6 周内切片, 连续切 4 μ m 切片 2 张, 分别置于经多聚赖氨酸处理过的载玻片上。1 张用于 IHC 检测, 另一张未染色的切片用于 FISH 检测。

1.3.1 荧光原位杂交 (FISH) 检测 HER2/neu: 标本处理程序严格按照说明书进行。杂交信号计数

选择细胞核大小一致, 核的边界完整、二脒基苯基吡啶 (DAPI) 染色均一, 细胞核孤立无重叠, 绿色着丝粒信号清晰的细胞, 随机计数 20~30 个癌细胞核中的双色信号。判读标准: ①红色信号的总数与绿色信号的总数比值 ≥ 2 时, 即为 HER2 基因扩增, 否则为无扩增; ②若红绿两信号的比值 >20 或众多信号连接成簇时可不计算, 即视为基因扩增; ③若比值介于 1.8~2.2 之间, 则需要再计数 20 个细胞核中的信号或由另外一个分析者重新计数。④若 HER-2 基因扩增在不同癌细胞中存在异质性时, 在另一癌区域再计算 30 个癌细胞核中的红、绿信号值, 计算其最大值, 并加以注释^[5]。

1.3.2 免疫组织化学 (IHC) 检测 ER, PgR, Bcl-2 和 Ki-67: ER 和 PR 分为 0, 1+, 2+ 和 3+ 按照百分比描述的强度, 根据 10 倍核染色领域的比例。ER, PR 阳性被定义为任何正分数或百分比大于零。Ki-67 $>10\%$ 和 Bcl-2 $>33\%$ 被认为阳性表达。

1.4 统计学分析 使用 SPSS16.0 软件包进行统计学分析, 两组样本计数资料的比较使用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 T1N0 and T1N1-3 临床病例特征 (单变量分析) [n(%)]

预后因素	T1N0 组 (n=139)	T1N1-3 组 (n=67)	χ^2	P 值
年龄				
<40 岁	19(50)	19(50)		
>40 岁	120(71.4)	48(28.6)	6.484	0.011
手术方法				
乳房切除术	8(50)	8(50)		
保乳手术	131(63.6)	59(28.6)	2.414	0.120
肿瘤大小分级				
T1a	3(75)	1(50)		
T1b	28(75.7)	9(24.3)	1.544	0.254
T1c	108(65.5)	57(34.3)		
HG				
1	31(83.5)	6(31.7)		
2, 3	108(63.9)	61(36.1)	5.466	0.019
NG				
1	58(62.4)	35(37.6)		
2, 3	81(71.7)	32(28.3)	2.017	0.159
ER				
+	36(65.5)	19(34.5)		
-	103(68.2)	48(31.8)	0.140	0.709
PgR				
+	38(60.3)	25(39.7)		
-	101(70.6)	42(29.4)	2.119	0.145
HER2/neu				
无扩增	100(74.1)	35(25.9)		
扩增	39(54.9)	32(45.1)	7.118	0.005
Ki-67				
<10%	58(78.4)	16(21.6)		
>10%	81(61.4)	51(38.6)	6.255	0.012
Bcl-2				
<33%	62(60.02)	41(39.8)		
>33%	77(68.2)	26(25.2)	4.977	0.026
LVI				
有	116(88.5)	15(11.5)		
无	23(30.7)	52(69.3)	72.813	<0.001

BCS=乳房保守外科手术; HG=组织学分级; NG=核分级; ER=雌激素受体; PgR=孕激素受体; HER2/neu=人表皮生长因子受体 2; LVI=淋巴管浸润。

2 结果 38 例 (18.4%) 年龄小于 40 岁, 168 例 (81.6%) 年龄超过 40 岁。BCS 190 例 (92.2%), 乳房切除术 16 例 (7.8%)。37 例 (18%) HG1 期肿瘤, 169 例 (82%) HG2 或 HG3 期肿瘤。ER 阳性 151 例 (73.3%) 和 HER2/neu 扩增 71 例 (34.5%)。Ki-67 标记指数增加 132 例 (64.1%), Bcl-2 表达增加 103 例 (50%) 和淋巴管浸润 LVI 83 例 (39.7%)。139 例淋巴结阴性 (T1N0) 和 67 例淋巴结阳性 (t1n1-3)。淋巴管浸润 LVI 出现 (P

<0.001)和 HER2/neu 扩增($P=0.005$)更易出现在淋巴结阳性。

在单变量分析中,诊断时的年龄, HG, LVI, HER2/neu 表达, Ki-67 标记指数和 Bcl-2 的表达是在 T1 期乳腺癌患者淋巴结转移相关的有统计学意义的预后因素。

3 讨论 最近的一项研究报告, ALNM 与 T1 乳腺癌肿瘤大小相关^[6]。当细分 T1 肿瘤为 T1a, T1b 和 T1c 期, 肿瘤大小和淋巴结转移之间的相关性在 T1 肿瘤无统计学意义(T1N0 vs t1n1-3)。其他研究者报道, 肿瘤的大小与 T1 期乳腺癌相关^[7]。HER2/neu 基因扩增和 LVI 是目前临床研究的重要指标, 而其他生物因子, 如 GG, 在多变量分析中 Ki-67 标记指数和 Bcl-2 的表达失去了意义, 虽然他们与临床相关的单因素分析具有统计学意义。有结果表明, 生物因子是乳腺小肿瘤的侵袭性的间接指标^[8]。LVI 已被广泛研究, 对乳腺癌的临床效果的预后意义, 认为存在 LVI 可以预测预后较差的浸润性乳腺癌可攻击行为的一个指标及原发性恶性肿瘤的转移能力^[9]。本研究结果与上述结果一致。

组织学分级作为乳腺癌预后因素的重要性已被在许多临床研究证明, 高分级肿瘤(低分化)较低分级肿瘤患者具有较早远处转移和较差的存活率。我们的研究还表明, HG2 和 HG3 的肿瘤患者更多出现在淋巴结阳性患者, 较淋巴结阴性 T1 患者在单因素分析有统计学意义。

本研究发现, Ki-67 的表达在淋巴结阳性组明显升高, 在单因素分析中有统计学意义。研究中 HER2/neu 扩增对预测 T1 乳腺癌患者非常有用, 具有 HER2/neu 扩增的乳腺癌具有侵袭性生物学行为, 与较高肿瘤分级和激素受体缺乏有关^[10]。本研究一个有趣的发现是 ALNM 和 bcl-2 表达的关系, 在乳腺癌中高 Bcl-2 的表达似乎是在许多研究中的良好的预后因素相关, 而 Bcl-2 是在癌细胞中已知的抗凋亡因子, 从而有可能使恶性细胞的增殖^[10]。在淋巴结阳性乳腺癌患者, 高 Bcl-2 表达与许多良好的预后因素有关, 它具有更好的临床结果。在乳腺癌患者有人用 33% 作为 Bcl-2 的预后评估价值^[11], 我们计算了 Bcl-2 染色的肿瘤细胞的比例, 分析了它使用以下截止值 $<1\%$, 10% , 33% , 80% 。当用 33% 作为 Bcl-2 的临界值, 它在单因素分析中具有统计学意义($P=0.026$)。

区域淋巴结转移或远处器官转移取决于原发性乳腺癌的侵袭。我们无法评估肿瘤侵袭能力准确的一些生物标志物, 因为肿瘤的侵袭性是由肿瘤个体生物特性和原发肿瘤和肿瘤周围的环境之间

复杂的相互作用的决定。在目前的研究中的生物标志物中, LVI 和 HER/neu 扩增与 T1 乳腺癌 ALMN 显著相关。

HER2/neu 过度表达和淋巴管浸润 LVI 与 T1 期乳腺癌患者淋巴结转移相关, LVI 是临床最有价值的预测性因素。术前活检仔细的腋窝淋巴结评估是检查 LVI 或 HER2/neu 扩增的必要步骤。

参考文献:

- [1] Rosen PP, Saigo PE, Braun DW, et al. Prognosis in stage II (T1N1M0) breast cancer [J]. Ann Surg, 1981, 194(5):576-584.
- [2] González-Vela MC, Garijo MF, Fernández FA, et al. Predictors of axillary lymph node metastases in patients with invasive breast carcinoma by a combination of classical and biological prognostic factors [J]. Pathol Res Pract, 1999, 195(9):611-618.
- [3] Tan LG, Tan YY, Heng D, et al. Predictors of axillary lymph node metastases in women with early breast cancer in Singapore [J]. Singapore Medical Journal, 2006, 46(12):693-697.
- [4] Port ER, Tan LK, Borgen PI, et al. Incidence of axillary lymph node metastases in T1a and T1b breast carcinoma [J]. Ann Surg Oncol, 1998, 5(1):23-27.
- [5] Quint LE. Imaging of anterior mediastinal masses [J]. Cancer Imaging, 7(Spec No A):S56-62.
- [6] Lee AH, Pinder SE, Macmillan RD, et al. Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma [J]. Eur J Cancer, 2006, 42(3):357-362.
- [7] Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(30):7703-7720.
- [8] Carcoforo P, Maestroni U, Querzoli P, et al. Primary breast cancer features can predict additional lymph node involvement in patients with sentinel node micrometastases [J]. World Journal of Surgery, 2006, 30(9):1653-1657.
- [9] Mustac E, Matusan-Ilijas K, Marijic B, et al. Predicting the likelihood of additional nodal metastases in breast carcinoma patients with positive sentinel node biopsy [J]. Int J Surg Pathol, 2010, 18(1):36-41.
- [10] Wasif N, Ye X, Giuliano AE, et al. Survey of ASCO members on management of sentinel node micrometastases in breast cancer: variation in treatment recommendations according to specialty [J]. Annals of Surgical Oncology, 2009, 16(9):2442-2449.
- [11] Park K, Kwak K, Kim J, et al. C-myc amplification is associated with HER2 amplification and closely linked with cell proliferation in tissue microarray of nonselected breast cancers [J]. Hum Pathol, 2005, 36(6):634-639.

收稿日期:2015-03-05

修回日期:2015-04-23